

泌尿器科悪性腫瘍における癌抑制遺伝子

金沢大学医学部泌尿器科学講座 (主任: 久住治男教授)

國 見 一 人

(平成3年1月21日受付)

網膜芽細胞腫における癌抑制遺伝子 (tumor suppressor gene, TSG) の研究成果をモデルとして, 制限酵素切断遺伝子多型性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析は種々のヒト悪性腫瘍に応用されてきた。RFLP 分析は, 腫瘍 DNA の染色体座位の欠失所見より間接的に欠失座位上の TSG に不活化が生じている事を示す。本研究では, 前立腺癌16例, 尿路移行上皮癌11例に第13, 14, 15, 21, 22染色体短腕を除く全染色体上に位置する DNA プローブを用い RFLP 分析を行った。前立腺癌では, 16例中10例 (63%) に少なくとも一つ以上の座位にヘテロ接合性の欠失 (loss of heterozygosity) が認められ, また第8, 10もしくは16染色体いずれかの座位欠失を伴っていた。ヘテロ接合性の欠失は16q (9例中6例, 67%), 8p (5例中2例, 40%), 10p (9例中3例, 33%), 10q (12例中4例, 33%) の順に高頻度に認められた。臨床病期が進展している症例ほど, また原発癌では癌細胞悪性度の高い症例ほど多数の座位に欠失がある傾向を示した。尿路移行上皮癌では, 11例全例に少なくとも第17, 11, 9染色体いずれかを含む座位にヘテロ接合性の欠失が認められ, 17p (11例中8例, 73%), 11p (11例中7例, 64%), 9p (10例中4例, 40%) に高頻度に認められた。前立腺癌と同様, 癌細胞悪性度の高い症例ほど座位欠失が多く認められた。以上より, ヘテロ接合性の欠失を示した染色体座位上に存在する TSG の不活化が各腫瘍の腫瘍原性に関与しているものと推察された。

Key words tumor suppressor gene, restriction fragment length polymorphism analysis, prostate cancer, urothelial cancer

ヒト悪性腫瘍の核型染色体分析 (karyotype analysis) は, その技術的進歩と相まって, 各腫瘍細胞染色体に特徴的な形態学的変化を探る上で重要な分析法である。遺伝子座位転座, 転位, トリソミーなどに加えて, 代表的な形態異常所見の一つとしてモノソミーを含めた特定染色体座位の欠失が挙げられている¹⁰⁾。網膜芽細胞腫の核型染色体分析において第13染色体長腕バンド14座位 (13q14) の欠失を認める報告³⁰⁾が散見され, 同座位の欠失が同腫瘍の発生に重要な意義を持つものと推察されている。

Cavenee ら³⁾, Dryja ら³¹⁾は, 分子生物学的手法を用い, 第13染色体上の座位より種々の DNA 断片を分離し, プラスミドに組み込み DNA プローブとして実用

化した。これら DNA プローブを同腫瘍の制限酵素切断遺伝子多型性分析 (restriction fragment length polymorphism, RFLP analysis) に用い, 核型染色体分析では13q14の欠失が検出不可能な症例でも腫瘍細胞染色体13q14を常に含む部位に2つのコピーのうち一方が欠失している事を報告した⁷⁸⁾。同時にその機能が欠失する事により腫瘍原性に関与するとされる癌抑制遺伝子 (tumor suppressor gene, TSG) が同座位に存在し, 一方の TSG のコピーが欠失し, かつ残存コピーに RFLP 分析上検出不可能な点突然変異等の遺伝子構造の変化が起こり, 産生蛋白の構造的・機能的変異が生じているものと推論している。その後, 13q14よりクロモゾームウォーキング法により retino-

Abbreviations: EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid 2 Na; p arm, short arm; q arm, long arm; RB1 gene, retinoblastoma 1 gene; RFLP, restriction fragment length polymorphism; SDS, sodium dodecyl sulfate; SSC, saline sodium citrate; TSG, tumor suppressor gene

blastoma 1 (RB1) 遺伝子と命名された想定 TSG がクローニングされた⁹⁻¹⁰。正常 RB1 遺伝子を樹立網膜芽細胞腫細胞株にトランスフェクションさせると、RB1 遺伝子の産生蛋白が発現されたと同時に腫瘍細胞の腫瘍原性が減弱した所見が得られた¹²。この所見は、正常 RB1 遺伝子が腫瘍原性を抑制する機能を有する TSG のカテゴリーに属する遺伝子である事を直接的に証明するものである。直腸癌、肺癌、乳癌をはじめとして種々の悪性腫瘍に RFLP 分析が応用され、各腫瘍に特異的な染色体欠失座位の同定がなされ、その結果に基づき新たな TSG がクローニング・同定されつつある¹³⁻¹⁵。

本研究では、前立腺癌と尿路移行上皮癌に RFLP 分析を行い、未だ明らかにされていないこれら腫瘍細胞の染色体欠失座位の同定を試みた。RFLP 分析はこれら腫瘍の発癌および癌細胞の生物学的進展に関わると考えられる特異的な欠失座位を検出するものである。

材料および方法

I. 材 料

今回検討した16症例の前立腺癌のうち、手術時に得られた原発癌10例、脳転移癌および所属リンパ節転移癌は各3例であった。摘出標本より癌組織片として約0.1-0.5g 採切し、また各個体の隣接正常組織片もしくは末梢白血球約20ml も併せて-80°C凍結保存し、それぞれ腫瘍 DNA、正常 DNA の抽出に用いた。各組織片より病理診断用切片を作成し、癌組織片の病理学的診断はすべて腺癌であり、また少なくとも50%以上の腫瘍細胞を含有していた。同様に肉眼的正常組織片には腫瘍細胞が含まれていない事を光顕的に確認した。

検討した11例の尿路移行上皮癌についても同様に組織片を採切・凍結保存した。癌組織片の病理学的診断はすべて移行上皮癌であり、少なくとも60%以上の腫瘍細胞が存在することを確認した。検討した全症例の臨床データを病理切片における%腫瘍細胞数とともに表1に示した。

II. DNA 抽出

1. 固形組織片

凍結固形組織片を室温にて解凍後直ちに溶解液(4mM guanidine thiocyanate, 5mM sodium citrate [pH7.0], 0.1M β -mercaptoethanol, および0.5% sarcosyl)を0.5ml 加えた後、液体窒素温度下に Retsch MMZ mill (f.a Kurt Retsch KG, Haan, West Germany) を用いて細粉状にした。次いで同溶

解液 2ml とセシウムクロライド0.96g を加え攪拌後、5.7M セシウムクロライド溶液 (0.1M ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA 加) 0.2ml をあらかじめ添加してある SW50.1ポリアロマーチューブ (Beckman, London, England) に重層した。35,000rpm, 25°Cで20時間超遠心分離後 DNA 分画である粘性中間層を採取し、5ml になるよう同溶解液を加え、さらに7.5M 酢酸アンモニウム液を0.35ml 加えた。2時間、37°Cインキュベート後 DNA 分画をエタノール沈殿させた。70%エタノールで軽く洗浄後、TE⁺溶液 (10mM Tris-HCl [pH7.6], 0.1mM EDTA) 約 2ml に溶解させた。

2. 末梢血

凍結血液を解凍後、血液量と等量の溶解液 (0.32M sucrose, 10mM Tris-HCl [pH7.6], 5mM EDTA, 5% Triton X-100) を混和し、3,000rpm, 室温で20分遠心した。上清を捨て核分画である沈殿に再度 Triton X-100 無添加の同溶解液を加え洗浄し、沈殿のみを残した。同溶解液 10ml と7.5M 酢酸アンモニウム液1.4ml を加え攪拌後2時間、37°Cインキュベートし、以後固形組織片における DNA 抽出の超遠心分離後と同様の処理をした。

DNA 濃度は、分光光度計 (Beckman, London, England) を用いて260nm 吸光度より算出した。

III. サザンブロッティング法

7 μ g DNA に対し制限酵素処理 (Taq I, Msp I, Hind III, Pst I, Bam HI, New England Biolabs, London, England, 反応時間はすべて12時間で、反応温度は Taq I は65°C, それ以外の酵素ではすべて37°C) を行った。酵素処理が充分であるか否かの判定として同時に反応液の一部 (10 μ l) を500ng λ DNA 溶液に加え、同時にインキュベートした。インキュベート後、アガロースゲル電気泳動により λ DNA の制限酵素切断バンドパターンが確認されれば、酵素処理が充分であるとした。真空蒸発遠心分離により反応液量を約20 μ l にまで減じ、プロモフェノールブルー液4 μ l を加え、0.6-0.8%アガロースゲル電気泳動 (1V/cm, 72時間) を行った。電気泳動後、ゲルを0.4M水酸化ナトリウム、0.6M塩化ナトリウム溶液にて20分、2回洗浄・変性させ、ナイロン膜 (Gene Screen-Plus, New England Nuclear, London, England) に同溶液下でトランスファーした。24時間トランスファー後、ナイロン膜を室温にて風乾し2時間80°C、ベイクンし、DNA をナイロン膜に固定した。

IV. ハイブリダイゼーション

ナイロン膜を 6 \times saline sodium citrate (SSC), 1%

sodium dodecyl sulfate (SDS), 100 μ g/ml 変性サケ精子, 0.2%フィコール, 0.2%ウシアルブミンおよび 0.2%ポリビニールピロリドンを含む溶液中で2時間, 65°Cのプレハイブリダイゼーションを行った. その後無作為オリゴヌクレオチド標識法 (random oligonucleotide priming method) にて 32 P 標識した DNA プローブとともにハイブリダイゼーション溶液 (6 \times

SSC, 1%SDS, 100 μ g/ml 変性サケ精子 DNA, 50%ホルムアルミドおよび 5%デキストランスルフェート) 中で24時間, 42°Cでハイブリダイゼーションを行った. 反応後, ナイロン膜を 2 \times SSC, 1%SDS 溶液で15分間, 室温, 次いで 0.1 \times SSC, 0.1%SDS 溶液で20分間, 65°C 2回, 最後に 0.1 \times SSC 溶液で5分間, 室温にて洗浄した. ナイロン膜を室温にて風乾し, -80°C

Table 1. Clinical summary in cases of prostate cancer (PC) and urothelial cancer (UC)

Case	Age at operation	Malig. grade (Gleason ^a /WHO ^b)	Stage ^c	% tumor cells in studied specimen ^d
PC1	62	5/P-U	TxNxM1 ^f	50
PC2	69	3-4/W-M	pT3N0M0	80
PC3	68	5/P	TxNxM1 ^f	90
PC4	72	3-4/M-P	T3N1M0 ^e	80
PC5	65	3/W-M	pT3N0M0	50
PC6	61	3/W-M	pT2N0M0	50
PC7	64	4-5/U	pT3N0M0	80
PC8	64	4-5/M	pT2N1M0	50
PC9	67	3/W-M	pT2N1M0	50
PC10	69	3-4/M	pT2N0M0	70
PC11	72	3-4/M	T3N1M0 ^e	85
PC12	58	4-5/M-P	pT3N1M0	60
PC13	67	4/M	pT3N0M0	50
PC14	54	3/M	TxNxM1 ^f	50
PC15	60	4-5/M-P	T1N1M1 ^e	90
PC16	59	3-4/W-M	pT3N0M0	50

Case	Age at operation	Sex	Malig. grade ^g	% tumor cells in studied specimen ^d
UC1	47	M	II	90
UC2	63	F	II	60
UC3	78	M	II	90
UC4	66	M	III	90
UC5	59	F	II	65
UC6	71	F	III	60
UC7	69	M	III	90
UC8	59	F	II	90
UC9	89	M	III	90
UC10	63	M	II	85
UC11	77	M	II	90

^a According to Gleason et al²⁹⁾.

^b According to WHO classification. Differentiation grade, W=well differentiated, M=moderately differentiated, P=poorly differentiated and U=undifferentiated³⁰⁾.

^c According to TNM classification³¹⁾.

^d Percentage of number of tumor cells in specimens analyzed.

^e Samples obtained from lymph node metastatic lesion.

^f Samples obtained from brain metastatic lesion.

^g According to WHO classification³²⁾.

にてオートラジオグラフィーを行った。

今回の検討では、非常に短い第13, 14, 15, 21, および22染色体短腕を除いた各染色体長腕・短腕座位より分離された DNA プローブを用いた (表2)。

DNA プローブとのハイブリダイゼーションにおいて正常 DNA で、サイズの異なる2つの座位 (allele) が検出された場合をヘテロ接合性あり (heterozygous or informative case) とし、2つの座位のサイズが同一で区別不可能な場合をホモ接合性あり (homozygous or not informative case) と定義し、ヘテロ接合性を有する座位のうち、一方の座位に由来するオートラジオグラフィー上のシグナルが腫瘍 DNA で消失もしくは著明な減弱を示した場合をヘテロ接合性の欠失 (loss of heterozygosity), これらを認めない場合をヘテロ接合性の保持 (retention of heterozygosity) と定義した。

成 績

今回用いた DNA プローブとハイブリダイゼーションし得られた座位のサイズは全て第10回ヒト遺伝子マッピング学会 (Human Gene Mapping 10) の報告¹⁰⁾と同一であった。

I. 前立腺癌

1. ヘテロ接合性の欠失

図1にヘテロ接合性の欠失を示すオートラジオグラムを示した。PC15にて第10染色体長腕 (10q), 第18染色体長腕 (18q) それぞれに位置する DNA プローブ, D10S25, D18S5をハイブリダイゼーションに用いた場合、両者ともに腫瘍 DNA で座位 A1 の欠失を示した。16例中10例 (63%) に少なくとも一つ以上の染色体短腕または長腕座位に、またそのうち、7例 (44%) に2つ以上の座位にヘテロ接合性の欠失が認められた。

Table 2. A panel of DNA probes examined in the present study

Chromosome	p arm	q arm
1	NFGB(N8C6), D1S2(L1.22)	REN(pHRnES1. 9)
2	D2S6(pXG-18), D2S44(pYNH24)	D2S3(p5-2-96)
3	RAF1(p627), D3F15S2E(H3H2)	D3S31(pMCT32. 1)
4	D4S10(pTV20), RAF1P1(c-raf-2P52)	FGA(pAF1)
5	D5S4(L1. 4), D5S21(pJ0110H-C)	D5S36(J0157E-A), D5S22(J0205H-C)
6	D6S10(pCH6), D6S8(p2C5)	MYB(pHM2. 6), D6S44(pYNZ132)
7	EGFR(pE7)	MET(pmetH)
8	D8S7(pSW50)	TG(pCHT16/8.0)
9	INFA(alphaIFM), INFB1(betaIFM)	ASSP3(pAS1), D9S7(pEFD126. 3)
10	D10S17(pMHZ15),	D10S25(pEFD75), D10S5(p9-12A)
11	HRAS(pTBB-2), D11S12(pADJ762), D11S16(p32-1)	PYGM(pMCMP1), D11S29(L7)
12	D12S16(pTHH14)	D11S34(phi2-11-2.2)
13		D12S7(pDL32B)
14		D13S3(p9A7), D13S5(pHUB8)
15		D14S1(pAW101)
16	HBZP1(pBRZ)	D15S1(pMS1-14), D15S29(pEFD49. 3)
17	D17S28(pYNH37. 3), MYH2(p10-5) D17S34(p146D6)	HP(hp2alpha)
18	D18S3(B74)	GH1(C-H800), D17S24(pRMU3)
19	D19S11(p13-1-82)	D18S5(OS-4)
20	D20S5(pR12. 21), D20S6(pD3H12)	D19S8(p17. 1)
21		D20S4(pMS1-27), D20S8(p1-34)
22		D21S8(pPW245D), D21S17(pGSH8)
XY	DXYS20(pDP230)	PDGFB(pSM-1)
		DXYS1X(pDP34)

The nomenclature of loci of DNA probes are listed with DNA probe names in parentheses. The DNA probes are located throughout whole chromosomal arms without the short arms of acrocentric chromosomes 13, 14, 15, 21 and 22.

表3に示す如く、ヘテロ接合性の欠失を有する染色体座位は多岐にわたっているものの16qに最も高頻度に(ヘテロ接合性を示した9例中6例〔67%〕)認められた。次いで第8染色体短腕(8p)上に5例中2例(40%)、18q上に5例中2例(40%)、10pに9例中3例(33%)、10qに12例中4例(33%)の順に高頻度にヘテロ接合性の欠失を示した。PC3では短腕・長腕両部にヘテロ接合性の欠失があり、第10染色体のモノソミーを示唆する所見が得られた。また、ヘテロ接合性の欠失を有した12例では全て少なくとも第16、8、10染色体いずれかにヘテロ接合性の消失が認められた。

2. 臨床病期・腫瘍細胞悪性度との相関性

表4に臨床病期および腫瘍細胞悪性度とヘテロ接合性の欠失との相関を示した。原発癌症例10例においてはPC7を除けばヘテロ接合性の欠失を呈した染色体座位は一箇所以下であった。尚、PC7では4箇所にヘ

テロ接合性の欠失が認められたが、原発癌症例中最も悪性度が高い症例であった。腫瘍細胞悪性度に従い原発癌症例を6例の高分化癌と4例の未分化癌とに分類して比較すると、平均染色体欠失座位数が高分化癌例では0.29であったのに対し、未分化癌例では1.67と高値を示した。3例の所属リンパ節転移癌症例は全例二箇所の染色体座位にヘテロ接合性の欠失が検出された。脳転移癌症例3例においては、4-6箇所の染色体座位(平均5箇所)に欠失を認めた。以上より、臨床病期が進展している症例ほど、また原発癌では腫瘍細胞悪性度が高い症例ほどヘテロ接合性の欠失を呈した染色体座位数が多くなる傾向を示した。

II. 尿路移行上皮癌

1. ヘテロ接合性の欠失

図2に尿路移行上皮癌症例2例(UC3, UC7)におけるRFLP分析のオートラジオグラムを示した。UC3の腫瘍DNAにて、IFNA1(9p)、D11S12(11p)の座位A1、MYH2(17p)の座位A2の欠失を認め、またD9S7(9q)PYGM(11q)およびD17S4(17q)のヘテロ接合性が保持されていた。UC7の腫瘍DNAでは、HRAS(11p)、D10S5(10q)の座位A1、D9S7(9q)、D17S34(17p)の座位A2の欠失があり、D11S34(11q)、D14S24(17q)のヘテロ接合性が保持されていた。検討した11例全例に少なくとも一つ以上の染色体座位にヘテロ接合性の欠失が認められた。表5に示す如く、前立腺癌症例と同様欠失した染色体座位は多岐に及んでいた。その中で17pに11例中8例(73%)と最も高頻度にヘテロ接合性の欠失を認めた。次いで11例中7例(64%)に11p、10例中(他1例は今回用いたDNAプローブに対し全てホモ接合性を示した。)4例(40%)に9pにヘテロ接合性の欠失を示した。そのうち1例(UC10)は17pおよびq両部に欠失を認め、同染色体のモノソミーを示唆する所見が得られた。11例全例少なくとも第17、11、もしくは9染色体のいずれかにヘテロ接合性の欠失を有していた。

前立腺癌症例にて高頻度に検出された16qもしくは8pのヘテロ接合性の欠失は、尿路移行上皮癌症例では1例にも認められなかった。また、第10染色体座位上では前立腺癌症例と比較しその頻度は低いものの7例中2例(29%)にヘテロ接合性の欠失が認められた。逆に尿路移行上皮癌にて高頻度に認められた17p、11p、および9p座位上のヘテロ接合性の欠失は前立腺癌症例では1例にも見られなかった。

2. 臨床病期・腫瘍細胞悪性度との相関性

今回検討した11例の尿路移行上皮癌は全例原発癌症例であり、臨床病期とヘテロ接合性の欠失との相関性

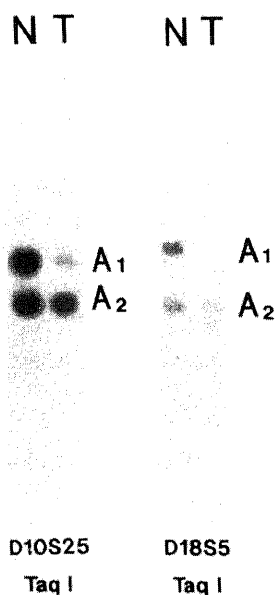


Fig. 1. Losses of heterozygosity on the long arm of chromosome 10 (10q) and the long arm of chromosome 18 (18q) in PC15. The designations of the DNA probes, D10S25 (10q) and D18S5 (18q) and the restriction enzyme used to digest the genomic DNA (Lane N, normal tissue; Lane T, tumor tissue) are indicated below each autoradiogram. The alleles observed are indicated to the right of each autoradiogram. Loss of A₁ alleles of both DNA probes is shown.

Table 3. Summary of loss of heterozygosity in prostate cancers

Case	Chromosomes with loci retaining heterozygosity	Chromosomes with allelic loss
PC1	1p, 3q, 4, 5, 6, 8q, 11q, 12, 13q, 14q, 17q, 18p	2p, 3p, 7p, 10q, 16q, XYp
PC2	1q, 2p, 3, 5, 6p, 7p, 9q, 10p, 11q, 12, 14q, 15q, 16q, 17p, 20q, 21q	
PC3	2p, 3, 4p, 5, 6p, 7, 9q, 11, 18p, 19q, 21q	10, 12, XYp
PC4	1p, 2, 3q, 4p, 5, 6p, 7, 8q, 9q, 10q, 11q, 12q, 14q, 15q, 18q, 19q, 20p, 21q, 22q	10p, 16q
PC5	1p, 3p, 4q, 5, 6p, 7, 10, 11, 12p, 14q, 15q, 16p, 18p, 19q, 20, 21q, 22q	16q
PC6	1p, 2p, 3q, 4p, 5, 6, 8p, 9q, 10q, 11p, 12, 13q, 15q, 16p, 17, 18p, 21q, 22q	
PC7	1, 2, 3q, 4, 5, 7, 10p, 11, 12q, 15q, 16p, 17p, 18p, 19q, 20q, XYp	10q, 13q, 16q, 18q
PC8	1q, 2p, 3, 4p, 5, 6q, 7, 8, 9q, 10q, 11, 12, 13q, 16p, 17, 18p, 20p, 21q, 22q, XYp	
PC9	1q, 2, 3p, 5, 6p, 7, 8q, 9q, 10p, 11, 14q, 16, 17q, 18, 19q, 20p, XYq	
PC10	1, 2q, 3q, 4, 5q, 7p, 9, 10, 11p, 12, 13q, 14q, 16q, 17q, 18, 19p, 21q, XYq	
PC11	1p, 3q, 4, 5, 6p, 7, 8q, 9q, 11, 12q, 13q, 16p, 17, 18p, 19q, XY	8p, 16p
PC12	2, 3p, 4, 5, 6, 7p, 8p, 9, 10q, 11, 12, 19q, 20q, 21q, XYq	10p
PC13	1, 2p, 3p, 5, 6, 7q, 9q, 11p, 12q, 15q, 16p, 18p, 19, 22q, XYq	
PC14	1, 2, 4, 5, 6p, 9p, 10q, 11p, 12, 13q, 15q, 16p, 17p, 18p, 19q, 21q, XY	3p, 16q, 17q, 22q
PC15	1q, 2p, 3, 4p, 5, 6q, 7, 9, 11p, 12, 13q, 18p, 19q, 20q, XYq	10q, 18q
PC16	3, 4q, 5, 6q, 7q, 8q, 10, 11, 12q, 13q, 15q, 18, 19, 20, XYq	8p

Chromosomes not delineated indicate that the individual was homozygous for all probes used. Chromosome number alone indicates that the tumor was heterozygous for the probes on both arms. If the chromosome number is followed by p or q, the individual was heterozygous only for that arm.

Table 4. The relationship between tumor grade among primary tumors or stage and frequencies of allelic losses in prostate cancers

Prostate cancer	Frequency of allelic loss	
	Average	Range
Primary tumors		
well differentiated (n=6)	0.012	0-0.043
low differentiated (n=4)	0.066	0-0.154
Metastatic tumors		
pelvic lymph node (n=3)	0.086	0.083-0.091
brain (n=3)	0.223	0.148-0.273

Frequency of allelic loss is the calculated value of the numbers of alleles lost divided by the numbers of heterozygous alleles in individual cases.

は検討出来なかった。表6に示したように、11例の腫瘍細胞悪性度はII(7例)もしくはIII(4例)であり、前者では平均染色体欠失部位数が2.57であったのに対して、後者ではそれぞれが5.00と多くなる傾向を示した。

考 察

腫瘍細胞の核型染色体分析により、様々な腫瘍特異的な染色体異常所見が報告され、その中でも染色体座位の欠失は、発癌もしくは癌細胞発育・増殖に関与する一つの重要な染色体異常所見とされている。網膜芽

細胞腫における13q14^{9,10}、腎癌における3pの欠失¹⁷⁻¹⁹はその代表例である。しかしながら、造血腫瘍の核型染色体分析の報告は多いのに対し、同分析法は培養操作を必要とするため前立腺癌をはじめとしてある種の固形腫瘍においては、短期培養法の発達は見られたものの未だ一致した特異的異常所見が得られていないのが現状である。また細胞培養操作の段階で癌細胞の発育環境が変化するため、二次的な変化が染色体に加わる可能性も示唆されている²¹。さらには核型を観察しうる細胞数に限度があるため、非クローン性の異常をも含めて検出する可能性もある。

腫瘍のRFLP分析は、上述の核型染色体分析上の欠点を補い、また遺伝子学的レベルで染色体座位欠失を検出する分析法として有用である。RFLP分析は、ヒト腫瘍組織より直接DNAを抽出し同一個体の正常組織より得られた正常DNAと比較・対照するため、培養操作を必要とせず、また腫瘍細胞間に共通した異常を検出するものである。網膜芽細胞腫に13q上に位置するDNAプローブを用いてRFLP分析が行なわれ、13q14の欠失が核型染色体分析上検出可能な症例に加えて、染色体核型像上それが認められない症例においても同座位の欠失が検出された²²⁻²⁴。このことは、網膜芽細胞腫において13q14の欠失は恒常的な異常であるものと結論されたと同時にその染色体異常が腫瘍原性に関与するものと推察された。腫瘍

染色体上のある特定の座位に欠失が生じている異常所見は、Harris ら²⁰⁾により提唱された癌抑制遺伝子、すなわちその機能的欠落が腫瘍原性に寄与するとされる遺伝子もしくは遺伝子的要因の存在概念を検証するも

のである。つまり、癌抑制遺伝子の不活化機序の一つが同遺伝子が存在する染色体座位の欠失として示されるものと解釈されている。

網膜芽細胞腫における一連の核型染色体分析・分子

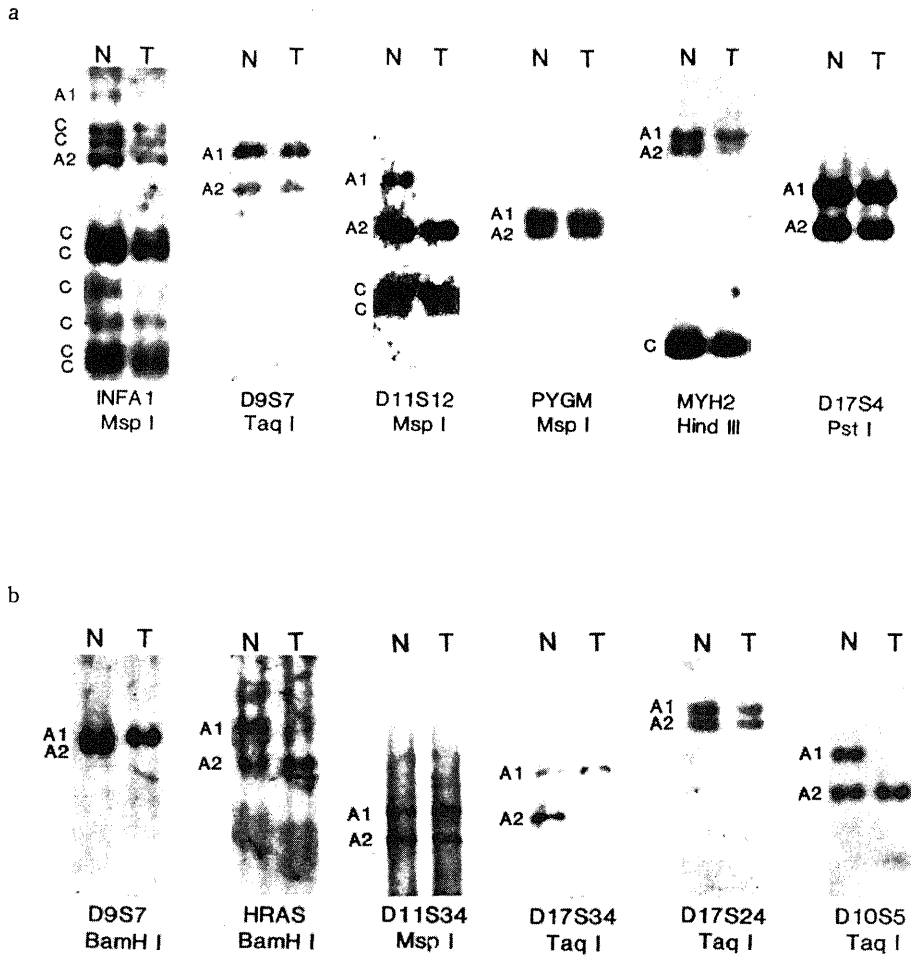


Fig. 2. Losses and retentions of heterozygosity in UC3 (2a) and UC7 (2b). The designations of the DNA probes and the restriction enzyme used to digest genomic DNA (Lane N, normal tissue; Lane T, tumor tissue) are indicated below each autoradiogram. The alleles observed are indicated to the right of each autoradiogram (C, constant band). In UC3, losses of heterozygosity are shown for the A1 allele of INFA1 (9p) and D11S12 (11p) and for the A2 allele of MYH2 (17p). Retentions of alleles of D9S7 (9q), PYGM (11q) and D17S4 (17q) are shown. In UC7, losses of heterozygosity are shown for the A1 allele of HRAS (11p) and D10S5 (10q) and for the A2 allele of D9S7 (9q) and D17S34 (17p). Retentions of alleles of D11S34 (11q) and D17S24 (17p) are shown.

Table 5. Summary of loss of heterozygosity in urothelial cancers

Case	Chromosomes with loci retaining heterozygosity	Chromosomes with allelic loss
UC1	1p, 2p, 3p, 5, 6, 7, 8q, 9, 10p, 14q, 15q, 16p, 17q, 18, 20, 21q, XY	11q, 13q, 17p
UC2	1q, 2, 4q, 5, 6p, 7, 8p, 10p, 11, 12q, 13q, 14q, 16, 17, 18, 20, 21q, 22q, XY	1p, 9p
UC3	1p, 2p, 4q, 6, 8, 9q, 10q, 11q, 12q, 13q, 14q, 16, 17q, 18q, 20p, 21q, 22q	5q, 9p, 11p, 17p, XY
UC4	1p, 2, 3, 5p, 6, 7, 8p, 9, 10, 11q, 12, 13q, 14q, 16p, 17, 18, 19, 20, 21q, XY	11p, 22q
UC5	1p, 2p, 4p, 5q, 6p, 7p, 8, 9p, 11, 12q, 13q, 14q, 15p, 16, 17q, 18p, 21q, 22q, XY	17p
UC6	3, 5q, 6, 7, 8p, 12q, 13q, 14q, 16, 17q, 18p, 19q, 20, XY	2p, 9p, 10q, 11p, 12p, 17p, 21q
UC7	1p, 3p, 4q, 6q, 7p, 8, 11q, 12q, 14q, 15q, 16, 17q, 18, 19, 20q, 21q, 22q, XY	2p, 5q, 8q, 9q, 10q, 11p, 13q, 17p, 22p
UC8	1, 2, 3p, 4q, 5p, 7, 8, 9, 11p, 12q, 13q, 16p, 17q, 18, 19q, 20, 21q, XY	14q, 17p
UC9	1, 2p, 3p, 4q, 5, 6, 7p, 8p, 9, 10q, 11q, 12p, 13q, 14q, 15q, 16q, 17, 19, 20p, 21q, 22q, XY	11p, 18q
UC10	1, 2p, 4p, 5p, 9p, 10, 11q, 12, 13q, 14q, 16p, 18, 19q, 20p, 21q, 22q, XY	11p, 17
UC11	1, 2, 3p, 5, 6, 7p, 8q, 10q, 11, 12q, 13q, 14q, 15q, 16p, 17q, 18, 19, 20, 21q, 22q, XY	9p, 17p

Chromosomes not delineated indicate that the individual was homozygous for all probes used. Chromosome number alone indicates that the tumor was heterozygous for the probes on both arms. If the chromosome number is followed by p or q, the individual was heterozygous only for that arm.

Table 6. The relationship between tumor grade among primary tumors and frequencies of allelic losses in urothelial cancers

Urothelial cancer	Frequency of allelic loss	
	Average	Range
Primary tumors		
Grade II (n=7)	0.100	0.043-0.200
Grade III (n=4)	0.172	0.061-0.290

Frequency of allelic loss is the calculated value of the numbers of alleles lost divided by the numbers of heterozygous alleles in individual cases.

生物学的研究体系の結果をふまえて、直腸癌、肺癌、乳癌、腎癌、脳腫瘍など他のヒト悪性腫瘍に RFLP 分析が応用され、欠失座位の同定は、核型染色体分析にて欠失もしくは異常が認められた染色体上に位置する DNA プローブを用いて行われるようになった。中でも、直腸癌は最も研究されている腫瘍であり、Vogelstein ら²⁰は非常に短い領域である第13, 14, 15, 21, および22染色体短腕を除く全ての染色体短・長腕部位に位置する DNA プローブを用いた RFLP 分析を行い、腫瘍 DNA におけるヘテロ接合性の欠失をもって座位の欠失とみなした。核型染色体分析にて全染色体の核型像が光顕的に示されるのに対比し、上述の如く、DNA プローブにて検討しうる染色体すべてに RFLP 分析を応用した Vogelstein らの分析法は対立遺伝子座分析 (allelotype analysis) と呼ばれている。とりわけ前立腺癌など恒常的な座位欠失所見が得られていない腫瘍においてこの対立遺伝子座分析は有

用である。また、核型染色体分析法に指摘されている限界を凌駕し、TSG の不活化が生じている事を示唆する欠失座位の同定・スクリーニングとして意義を持つ検定方法である。本研究では、対立遺伝子座分析を泌尿器系悪性腫瘍である前立腺癌および尿路移行上皮癌に適用し、遺伝子学的レベルで、かつ広くこれら腫瘍に特異的なもしくは他の悪性腫瘍にも共通して認められている染色体欠失座位の同定を試みた。

前立腺癌の RFLP 分析は未だ他にその報告を見ないが、今回検討した16例中10例 (63%) にいずれかの染色体座位に欠失を示すヘテロ接合性の欠失が認められ、高頻度に染色体座位の欠失が前立腺癌細胞 DNA に生じており、前立腺癌の腫瘍原性に関与している可能性が示唆された。10例で欠失を示した染色体座位のうち、16q, 8p, 10p, 10q の順に高頻度に欠失が示され、また10例全例に少なくともこれらいずれかの座位の欠失を呈した事より、癌化に関係する TSG がこれらの座位に存在し、かつその不活化が起こっていることが示唆される。16q の欠失は、多くのヒト悪性腫瘍の RFLP 分析結果のうち、Larsson ら²²の検討した乳癌においても報告されている。前立腺癌、乳癌といったホルモン依存性因子が発癌もしくは癌発育・進展に何らかの影響を及ぼしているタイプの腫瘍と 16q 座位の欠失との関連性は明らかにされていないが、これらの腫瘍原性に特異的な遺伝子学的異常・変異を探る上で、興味ある所見と思われる。次いで多く認められた 8p の欠失は、その頻度は少ないものの直腸癌の対立遺伝子座分析においても報告されているが²³、他の

悪性腫瘍においては全く指摘されておらず、これら両腫瘍に特異的な所見である。一方、ホルモン非依存性増殖を示す前立腺癌培養細胞株 LNCaP の核型染色体分析では、8p の欠失が認められなかったのに対し、ホルモン依存性増殖を示すように変化した娘細胞株 LNCaP では同座位の欠失が認められており、この染色体異常がホルモン依存性因子に関連したものである事を支持する報告²⁰⁾が見られる。10p と 10q の欠失は、脳腫瘍の RFLP 分析において、病理組織学的診断上、未分化星状細胞腫、悪性度Ⅲからグリオブラストーマ、悪性度Ⅳに癌細胞の生物学的進展を示す段階で生ずる遺伝子学的背景である事が示されているが²⁰⁾、前立腺癌においてはどのように関与しているかは不明である。網膜芽細胞腫における 13q14 の欠失は、その後の RFLP 分析の結果、骨肉腫、肺小細胞癌、乳癌、肝癌などにも高い出現頻度で認められる事が報告されており^{13)~15)}、これら腫瘍に共通した染色体異常である事、つまり同一 TSG の不活化がこれらの腫瘍原性に関与するものと考察されているが、今回検討した前立腺癌では 9 例中わずか 1 例に第13染色体上のヘテロ接合性の欠失が認められたのみであり、RB1 遺伝子の不活化は前立腺癌においてはあまり関与しないものと考えられた。

前立腺癌の細胞悪性度および臨床病期と RFLP 分析にて検出された欠失座位数との相関においては、細胞悪性度が高くなるほど、また、臨床病期が進んでいるほど、欠失座位数の増加、すなわち多くの TSG の不活化が腫瘍 DNA で起きている傾向が得られた。これは、癌発育・進展過程における従来用いられてきた病理組織学的評価に加えて、遺伝子学的異常を背景とする新たな観点に基づく評価方法になりうる可能性を秘めているものと考えられた。

尿路移行上皮癌においては、17p, 11p, および 9p 座位の順に高い頻度でヘテロ接合性の欠失が認められた。以前、Fearon ら²⁰⁾は同腫瘍の核型染色体分析結果をふまえて、第11染色体上に位置する DNA プローブを用いて短腕座位に高頻度でヘテロ接合性の欠失が生じていることを報告している。本研究では対立遺伝子座分析を行なったため、11p に加えて 17p, 9p 両座位にも TSG の不活化が起きていることが判明した。17p の欠失は、直腸癌、肺癌、乳癌、グリオーマ、卵巣癌、副腎皮質癌など多くの腫瘍型で報告されており^{13)~15)}、これらの腫瘍では、同部に局在する TP53 遺伝子座位の一つが欠失し、残存する TP53 遺伝子の点突然変異等が証明されており²⁰⁾、従って尿路移行上皮癌においても TP53 遺伝子が癌抑制遺伝子としてその

不活化がその腫瘍原性に関与していると考察される。さらに直腸癌では、TP53 遺伝子の不活化は腺腫、悪性度Ⅲから癌腫への移行期に起こる遺伝子学的異常である事が示されている²¹⁾。11p の欠失は、その頻度は腫瘍型の相違より異なるものの乳癌、肝癌、胃癌、卵巣癌、横紋筋肉腫、褐色細胞腫などからも広く検出されている^{13)~15)}。9p の欠失は他の固形腫瘍においては報告を見ない。

13q の欠失は、前立腺癌と同様、11例中 2 例 (18%) と頻度は低く、RB1 遺伝子の不活化は尿路移行上皮癌においても主要な異常でない事が推察された。

尿路移行上皮癌の細胞悪性度の進展に従い、不活化している TSG の数が多くなる傾向を認めた。本研究で検討した尿路移行上皮癌はすべて原発癌であったために臨床病期との相関性については検討出来なかったが、Tsai ら²⁰⁾が比較的進展した膀胱移行上皮癌の RFLP 分析を行い高頻度の 9p 座位の欠失を報告している事より、今回の検討結果と合わせて、同座位に存在すると考えられる TSG の不活化は臨床病期が比較的進展する際の現象と捉える事ができる。

以上より、前立腺癌及び尿路移行上皮癌それぞれに高頻度に検出された染色体座位の欠失は、これらの腫瘍型における発癌もしくは癌発育・進展に関わる TSG の不活化現象が存在することを示唆する所見であった。

結 論

前立腺癌16例及び尿路移行上皮癌11例に第13, 14, 15, 21, 22染色体短腕を除く全染色体座位に位置する DNA プローブを用いて RFLP 分析を行い、これら腫瘍型の腫瘍原性に関与すると推察される癌抑制遺伝子の局在を検討し、以下の結果を得た。

1. 前立腺癌においては16例中10例 (63%) に少なくとも一つ以上の染色体座位にヘテロ接合性の欠失が認められ、16q (67%), 8p (40%), 10p (33%), および 10q (33%) に高頻度に欠失が得られた。

2. 尿路移行上皮癌においては11例全例に少なくとも一つ以上の染色体にヘテロ接合性の欠失が生じており、17p (73%), 11p (64%), および 9p (40%) の順に高頻度に欠失が得られた。

3. 両腫瘍ともに腫瘍細胞の悪性度が高い症例ほど、また前立腺癌においては臨床病期が進んでいる症例ほど多くの座位欠失を示す傾向が見られた。

4. 以上、腫瘍 DNA にて欠失を示した染色体座位上に各腫瘍型の腫瘍原性に関与するものと推察される癌抑制遺伝子が不活化している可能性がある。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始、御指導と御校閲を賜りました恩師久住治男教授に深く感謝致します。また、本研究の遂行にあたり、御指導、御協力を戴きました金沢大学泌尿器科学教室員各位に厚くお礼申し上げます。さらに、直接御指導、御教示を賜りましたスウェーデンカロリンスカ病院・研究所、Lennart Andersson 教授、Vincent Peter Collins 教授に深謝致します。

文 献

- 1) Mitelman, F. & Heim, S.: Consistent involvement of only 71 of the 329 chromosomal bands of the human genome in primary neoplasia-associated rearrangements. *Cancer Rec.*, **48**, 7115-7119 (1988).
- 2) Testa, J. R.: Chromosome translocations in human cancer. *Cell Growth Differ.*, **1**, 97-101 (1990).
- 3) Knudson, A. G., Meadows, A. T., Nichols, W. W. & Hill, R.: Chromosomal deletion and retinoblastoma. *N. Engl. J. Med.*, **295**, 1120-1123 (1976).
- 4) Yunis, J. J. & Ramsay, N. K. C.: Retinoblastoma and subband deletion of chromosome 13. *Am. J. Dis. Child.*, **132**, 161-163 (1978).
- 5) Cavenee W. K., Dryja, T. P., Philips, R. A., Renedict, W. F., Godbout, R., Gallie, B. L., Murphree, A. L., Strong, L. C. & White, R. L.: Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature*, **305**, 779-784 (1983).
- 6) Dryja, T. P., Rapaport, J. M., Weichselbaum, R. & Bruns, G. A. P.: Chromosome 13 restriction fragment length polymorphism. *Hum. Genet.*, **65**, 320-324 (1984).
- 7) Hansen, M. F. & Gavenne, W. K.: Retinoblastoma and the progression of tumor genetics. *Trends Genet.*, **4**, 125-128 (1988).
- 8) Gavenne, W. K. & Hansen, M. F.: Molecular genetics of human familial cancer. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.*, **1**, 829-835 (1988).
- 9) Friend, S. H., Bernards, S., Rogelj, S., Weinberg, R. A., Rapaport, J. M., Albert, D. M. & Dryja, T. P.: A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*, **323**, 643-646

(1986).

- 10) Friend, S. H., Horwitz, J. M., Gerber, M. R., Wang, X. F., Bogenman, E., Li, F. P. & Weinberg, R. A.: Deletions of a DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**, 9059-9063 (1987).
- 11) Lee W. H., Bookstein, R., Hong, F., Young, L. J., Shew, J. Y. & Lee, E. Y. H. P.: Human retinoblastoma susceptibility gene: Cloning, identification, and sequence. *Science*, **235**, 1394-1399 (1987).
- 12) Fung, Y. K. T., Murphree, A. L., T'Ang, A., Qian, J., Hinrichs, S. H. & Benedict, W. F.: Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. *Science*, **236**, 1657-1661 (1987).
- 13) Green, A. R.: Recessive mechanisms of malignancy. *Br. J. Cancer*, **58**, 115-121 (1988).
- 14) Ponder, B.: Gene losses in human tumours. *Nature*, **335**, 400-402 (1988).
- 15) Sager, R.: Tumor suppressor genes: The puzzle and the promise. *Science*, **246**, 1406-1412 (1989).
- 16) Kidd, K. K., Bowcock, A. M., Schmidtke, J., Track, R., K., Riccuti, F., Hutchings, G., Bale, A., Pearson, P. & Willard, H. F.: Report of the DNA committee and catalog of cloned and mapped genes and DNA polymorphisms. Tenth International Workshop on Human Gene Mapping. *Cytogenet. Cell Genet.*, **51**, 622-947 (1989).
- 17) Yosida, M. A., Ohyashiki, K., Ochi, H., Gibas, Z., Pontes, J. E., Prout, G. R., Huben, R. & Sandberg, A. A.: Cytogenetic studies of tumor tissue from patients with nonfamilial renal cell carcinoma. *Cancer Res.*, **46**, 2139-2147 (1986).
- 18) Yoshida, M. A., Ohyashiki, K., Ochi, H., Gibas, Z., Prout, G. R., Pontes, J. E., Huben, R. & Sandberg, A. A.: Rearrangement of chromosome 3 in renal cell carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet.*, **19**, 351-354 (1986).
- 19) Kovacs, G., Szucs, S., De Reise, W. & Baumgatel, H.: Specific chromosomal aberration in human renal cell carcinoma. *Int. J. Cancer*, **40**, 171-178 (1987).
- 20) Harris, H., Miller, O. J., Klein, G., Worst, P. & Tachibana, T.: Suppression of malignancy

by cell fusion. *Nature*, **223**, 363-368 (1969).

21) Vogelstein, B., Fearon, E. R., Kern, S. E., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Nakamura, Y. & White R.: Allelotype of colorectal carcinoma. *Science*, **244**, 207-211 (1989).

22) Larsson, C., Bystrom, C., Sloog, L., Rotstein, S. & Nordenskjold, M.: Chromosomal mutations in human breast carcinoma. *Genes, Chromosomes and Cancer*, in press (1990).

23) Koning, J. J., Kamst, E., Hagemeyer, A., Romijn, J. C., Horoszewicz, J. & Schroder, F. H.: Cytogenetic characterization of several androgen responsive and unresponsive sublines of the human prostatic carcinoma cell line LNCaP. *Urol. Res.*, **17**, 79-86 (1989).

24) James, C. D., Carlom, E., Dumanski, J. P., Hansen, N., Nordenskjold, M., Collins, V. P. & Cavenee, W. K.: Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages. *Cancer Res.*, **48**, 5546-5551 (1988).

25) Fearon, E. R., Feinberg, A. P., Hamilton, S. H. & Vogelstein, B.: Loss of genes on the short arm of chromosome 11 in bladder cancer. *Nature*, **318**, 377-380 (1985).

26) Nigro, J. M., Baker, S. J., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., Hostetter, R., Cleary, K., Bigner, S. H., Davidson, N., Baylin, S., Devilee, P., Glover, T., Collins, F. S., Weston, A., Modari, R., Harris, C. C. & Vogelstein, B.: Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*, **342**, 705-708 (1989).

27) Vogelstein, B., Fearon, E. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M. M. & Bos, J. L.: Genetic alterations during colorectal tumor development. *N. Engl. J. Med.*, **319**, 525-532 (1988).

28) Tsai, Y. C., Nichols, P. W., Hiti, A. L., Williams, Z., Skinner, D. G. & Jones, P. A.: Allelic losses of chromosome 9, 11, and 17 in human bladder cancer. *Cancer Res.*, **50**, 44-47 (1990).

29) Gleason, D. F. & Mellinger, G. T.: Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J. Urol.*, **111**, 58-64 (1974).

30) World Health Organization: Histological typing of prostate tumours. In F. K. Mostofi, I. Sesterhenn & L. H. Sobin (eds.), *International Histological Classification of Tumours*, 1st ed. p1-26, Springer-Verlag, Geneva, 1973.

31) International Union Against Cancer: Urological tumours. In P. Hermanek & L. H. Sobin (eds.), *TNM Classification of Malignant Tumours*, 4th ed. p121-144, Springer-Verlag, Geneva, 1987.

32) World Health Organization: Histological typing of urinary bladder tumours. In F. K. Mostofi, I. Sesterhenn & L. H. Sobin (eds.), *International Histological Classification of Tumours*, 1st ed. p27-49, Springer-Verlag, Geneva, 1973.

Tumor Suppressor Genes Involved in Human Urological Malignant Tumors

Kazuto Kunimi, Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920
—J. Jusen Med. Soc., **100**, 165—176 (1991)

Key words tumor suppressor gene, restriction fragment length polymorphism analysis, Southern blotting, prostate cancer, urothelial cancer

Abstract

A series of studies on retinoblastomas have been a paradigm for research of the tumor suppressor gene (TSG). Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses have been applied to diverse human malignant tumors, and show allelic deletions in tumor DNA, indirectly indicating that inactivation of TSGs at the loci deleted has occurred. In the present study, RFLP analysis was performed in 16 cases of prostate cancer and 11 cases of urothelial cancer. Plasmid DNA probes, mapped on whole chromosomal regions except for the short arms of acrocentric chromosomes, 13, 14, 15, 21, and 22, were used. Among the prostate cancers, losses of heterozygosity were detected in at least one chromosomal region in 10 of the 16 cases (63%). In no case were allelic losses found, unless one of chromosomes 8, 10 or 16 had deletions. Frequent allelic losses were detected on the long arm of chromosome 16 (16q) (6 out of 9 heterozygous cases, 67%), the short arm of chromosome 8 (8p) (2 out of 5 cases, 40%), 10p (3 out of 9 cases, 33%), and 10q (4 out of 12 cases, 33%). There was a tendency that more allelic deletions would be detected in the more advanced cases and in the primary tumors with a higher grade malignancy. Among the urothelial tumors, all cases had allelic losses in at least one chromosomal regions including either chromosomes 17, 11 or 9. Allelic deletions were detected on 17p (8 out of 11 cases, 73%), 11p (7 out of 11 cases, 64%), and 9p (4 out of 10 cases, 40%) at high frequencies. As in the prostate cancers, higher grade malignant tumors showed a tendency to have more allelic deletions. In summary, the chromosomal regions with allelic loss indicate that inactivation of TSGs at those loci has occurred in the tumor DNA which is related to the oncogenesis of these tumor forms.